Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin der
Universität Halle/S.
Direktor: Prof. Dr. Schrader.

Die volumenometrische Bestimmung des Rezeptoren- und Agglutiningehaltes im Vergleich mit der titrometrischen Bestimmung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frieda Haellmigk
aus Ressen, Halle/Saale.

1938.

Buchdruckerei Richard Mayr, Würzburg.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Halle-Wittenberg.

1. Berichterstatter: Doz. Dr. Ponsold

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Schrader

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 1938

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsangabe.

A. Einleitung.

B. Hauptteil.

I. Die Objektträger-Titriermethode.

II. Die Kapillar-Volumenometrie.

III. Die Anwendung der Objektträger-Titriermethode und der Kapillar-Volumenometrie in Versuchen.

a) Zur Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen.

b) Zur Bestimmung der Serumstärken.

C. Zusammenfassung.

Einleitung.

Die Fortschritte auf dem Gebiete der Blutgruppenforschung haben dazu geführt, daß sich zahlreiche Autoren mit der quantitativen Auswertung sowohl der Serum- als auch der Blutkörperchen-Eigenschaften befaßt haben. Es sind verschiedene Methoden angegeben worden, mit denen z. T. recht unterschiedliche Ergebnisse erzielt worden sind. Eckhard hat daraufhin 1935 eine Arbeit verfaßt, in der er die wichtigsten dieser Methoden auf ihre Genauigkeit und Brauchbarkeit hin untersucht und vergleicht. Er kommt dabei zu dem Ergebnis, daß die von Ponsold angegebene Kapillarmethode zur quantitativen Auswertung von Seren bisher die genaueste ist, mit der die sichersten Ergebnisse erzielt werden können. An die zweite Stelle ist nach Eckhard die Objektträger-Titriermethode zu setzen, die zwar in kürzerer Zeit ausgeführt werden kann als die Kapillarröhrchenmethode, aber mehr Material erfordert und in den Ergebnissen etwas ungenauer ist. Die Kapillarröhrchenmethode darf nach Eckhard bis jetzt als die exakteste Methode zur quantitativen Auswertung von Seren gelten. Sie hat sich aber noch nicht durchsetzen können, da sie ein erhebliches Maß an Zeit und Mühe beansprucht und darum für den praktischen Gebrauch noch zu kompliziert ist.

Es käme also darauf an, eine Methode zu finden, die bessere Ergebnisse erzielen läßt als die Objektträger-Titriermethode. dazu weniger Material erfordert als diese, jedoch nicht soviel Aufwand an Zeit und Mühe beansprucht wie die Titrometrie mittels der Kapillarröhrchenmethode.

Bei allen bisher bekannten Methoden zur quantitativen Auswertung von Seren sind zwei Faktoren für das Ergebnis ausschlaggebend, die unabhängig von der Technik sind, die Agglutinabilität der roten Blutkörperchen und der Agglutiningehalt des Serums. Da die Methoden jeweils mit den gleichen, sog. Testblutkörperchen durchgeführt werden, stellt die Agglutinabilität einen konstanten Faktor dar, der darum bei dem Ergebnis unberücksichtigt bleiben kann.

Die roten Blutkörperchen besitzen die Eigenschaft, die entsprechenden Agglutinine eines Serums zu binden; diese Rezeptorfähigkeit geht annähernd mit der Agglutinabilität parallel. Sie wurde bisher ebenfalls mit der Titriermethode ermittelt, indem ein bestimmtes sog. Testserum mit den verschiedenen, auf ihre Rezeptorfähigkeit zu untersuchenden Blutkörperchen titriert wurde. Dadurch konnte für die Er-

gebnisse der Agglutiningehalt des Serums als konstanter Faktor unberücksichtigt bleiben.

Wenn es ein Verfahren gäbe, das eine möglichst exakte Messung dieser Rezeptorfähigkeit der roten Blutkörperchen gestattete, so könnte es auch dazu benützt werden, ausgehend von Blutkörperchen mit bestimmter Rezeptorfähigkeit, die Menge der im Serum enthaltenen Agglutinine zu ermitteln.

Die Arbeiten von Ponsold über „Mikroabsorptionsverfahren zum Nachweis der Blutuntergruppen A_1 und A_2" und „Ein Absorptionsverfahren ohne Titerreduktionsbestimmung zum Nachweis der Blutimmunfaktoren M und N" ließen den Gedanken aufkommen, die darin angegebenen Methoden für ein volumenometrisches Verfahren zur Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen zu verwenden, um dann mittels der Rezeptorfähigkeit eine quantitative Bestimmung von Seren vornehmen zu können.

Ponsold hat nun versucht, dieses Verfahren zur Bestimmung der Rezeptorstärke auszuarbeiten, dessen Prinzip darauf beruht, die Menge von Blutkörperchen zu ermitteln, die nötig ist, ein bekanntes Serum zu erschöpfen. Das Verfahren hierfür sei kurz „Kapillar-Volumenometrie" genannt.

Es soll die Aufgabe dieser Arbeit sein, sowohl das Verfahren der Kapillar-Volumenometrie als auch die Objektträger-Titriermethode an ein und demselben Material durchzuführen, um dadurch die praktische Anwendbarkeit der Kapillar-Volumenometrie im Vergleich zur Objektträger-Titriermethode für die Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen und des Agglutiningehaltes der Seren zu erproben.

Hauptteil.

Die Objektträger-Titriermethode.

Es wird eine Verdünnungsreihe des Serums auf den Objektträgern angelegt, wobei die Verdünnungsgrade 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 usw. betragen. Als Objektträger wurden Porzellanplatten mit hohlgeschliffenen Vertiefungen verwendet. Danach wird eine 1 bis 3%ige Blutkörperchenaufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung hinzugefügt, um möglichst wenig Blutkörperchen zuzusetzen und dadurch die Agglutination deutlicher in Erscheinung treten zu lassen. Da aber durch eine so dünne Aufschwemmung von Blutkörperchen, wenn irgendeine beliebige Menge zugesetzt würde, die vorher genau fertiggestellte Verdünnungsreihe des Serums willkürlich verändert würde, wird also die gleiche Menge Blutkörperchenaufschwemmung hinzugefügt, wie sie sich als Flüssigkeitsmenge jeweils auf den Objektträgern befindet. Dadurch wird das auf den Objektträgern befindliche Serumgemisch jeweils mengenmäßig verdoppelt und auf das doppelte verdünnt, so daß eine Verdünnungsreihe von 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 usw. entsteht. Darauf wird mit einem Glasstab auf jedem Objektträger die Blutkörperchenaufschwemmung mit der Serumverdünnung gut durchmischt und in feuchter Kammer etwa 30 Minuten möglichst an einen kühlen Ort gestellt, damit keine Verdunstung der Flüssigkeit eintreten kann, wodurch nach 30 Minuten das Ergebnis nicht mehr ablesbar wäre.

Nach 30 Minuten hat das Serum die Blutkörperchen zusammengeballt. Es wird nun genau beobachtet, auf welchen Objektträgern eine Zusammenballung der Blutkörperchen stattgefunden hat.

Die Fähigkeit des Serums, Blutkörperchen zusammenzuballen, nimmt mit steigender Verdünnung ab, da der Agglutiningehalt immer geringer wird. Als Grenzwert wird die Verdünnungsstufe genommen, bei der eben noch eine Zusammenballung der Blutkörperchen mit bloßem Auge auf dem Objektträger erkennbar ist. Es ist ratsam, die Verdünnungsreihen bis zu der Verdünnungsstufe 1 : 1028 anzulegen, da manche Seren bis zu dieser Verdünnung agglutinieren können.

Die Durchführung der Titrometrie zeitigt mancherlei Schwierigkeiten, auf die hier im Anschluß gleich hingewiesen werden soll. Die Ablesbarkeit des Titers beim Auswerten der Titrometrie hängt ab von der Zusammenballbarkeit der roten Blutkörperchen. An die Erkennung dieser Agglutinate ist die Auswertung des Serums gebunden.

Die Entstehung der Agglutinate ist abhängig von der Menge der im Serum vorhandenen Agglutinine und von der Agglutinabilität der roten Blutkörperchen. Die Agglutinabilität der roten Blutkörperchen ist nicht konstant, sondern ändert sich mit dem Alter des Blutes. Das heißt, sind die Blutkörperchen schon längere Zeit entnommen worden, so wird ihre Agglutinabilität umso geringer sein, je älter die Blutkörperchen sind. Also je mehr Zeit zwischen Entnahme vom Lebenden und Durchführung der Titerbestimmung liegt, umso geringer ist die Zusammenballbarkeit der roten Blutkörperchen. Daher ist es ratsam, nur frisch entnommene Blutkörperchen zu verwenden. Zudem haben die Blutkörperchen jedes einzelnen Menschen eine bestimmte Zusammenballbarkeit, die verschieden groß sein kann. Sie müßte daher bei der Auswertung eines Serumtiters berücksichtigt werden. Demnach können Blutkörperchen mit einer hohen Zusammenballbarkeit von Seren besser agglutiniert werden. Das Serum kann in höheren Verdünnungsstufen diese Blutkörperchen noch zusammenballen, so daß diese Blutkörperchen für das Serum einen höheren Titer ergeben. Blutkörperchen mit geringerer Zusammenballbarkeit können vom Serum weniger gut agglutiniert werden. Das Serum wird also in höheren Verdünnungsstufen nicht mehr fähig sein, diese Blutkörperchen zusammenzuballen. Der Titer bei Verwendung solcher Blutkörperchen wird entsprechend niedriger sein.

Auch die Zeit, in der das Serum mit seinen Agglutininen auf die roten Blutkörperchen einwirken kann, spielt bei der Entstehung der Agglutinate eine beachtenswerte Rolle. Die hauptsächlichste Agglutination findet schon in den ersten Minuten nach dem Zusetzen der Testblutkörperchen zu den Serumverdünnungen statt. Jedoch geht in den nächsten 2 Stunden die Agglutination häufig noch etwas weiter, so daß danach der Titer eine bis höchstens 2 Stufen höher ablesbar wird. Bei den stärkeren Verdünnungen braucht das Serum offenbar längere Zeit, um mit seinen Agglutininen die roten Blutkörperchen zusammenballen zu können. Ein 2 Stufen höherer Titer nach 2 Stunden kommt aber sehr selten vor. Meist handelt es sich nur um eine Stufe. Oft tritt auch gar keine weitere Agglutination ein, so daß der Titer später nicht höher ablesbar wird, als nach der ersten halben Stunde. 30 Minuten ist aber die übliche Grenze, die eingehalten werden muß, um eine Titerbestimmung durchzuführen.

Die Erkennung der Agglutinate ist abhängig von der Menge der zugesetzten roten Blutkörperchen. Werden sehr viele Testblutkörperchen zugefügt, so kann das Serum in seinen höheren Verdünnungsstufen nicht mehr alle Blutkörperchen zusammenballen. Es kommt dann dazu, daß nicht agglutinierte Blutkörperchen in größerer Menge vorhanden sind als agglutinierte. Durch dieses Übergewicht der freien Blutkörperchen können vorhandene feine Agglutinate verdeckt werden und somit unbemerkt bleiben. Um das Verdecken von Agglutinaten

durch nicht agglutinierte Blutkörperchen in den hohen Verdünnungsstufen des Serums zu vermeiden, dürfen nur wenige Blutkörperchen den einzelnen Verdünnungsstufen zugesetzt werden; dadurch werden aber die entstehenden Agglutinate kleiner. Die Agglutinate können in den höheren Verdünnungsstufen des Serums so fein werden, daß es schwierig ist, sie mit bloßem Auge zu erkennen.

Das Resultat der Titrometrie und damit die quantitative Auswertung eines Serums ist an die angelegten Verdünnungsstufen des Serums gebunden. Durch die angewendete Methode der Anlegung von Verdünnungsstufen, bei der jede folgende Verdünnungsstufe eine Verdoppelung der Verdünnung der vorangehenden Stufe ist, kommt es zu einer Stufenfolge mit großen Zwischenräumen, die umso größer werden, je weiter die Verdünnung fortschreitet. Sehr deutlich werden diese weiten Zwischenräume zwischen den Verdünnungsstufen 1 : 64 — 1 : 128 — 1 : 256 und weiter. Durch diese weite Stufenfolge kann der Titer mehrerer Seren auf der gleichen Stufe ablesbar sein, es kann dadurch der Anschein erweckt werden, diese Seren seien gleich stark, während der eigentliche Titer der Seren in dem Zwischenraum zwischen der ablesbaren Stufe und der folgenden Stufe liegt. Da diese Zwischenräume so groß sind, kann also noch ein Unterschied zwischen den einzelnen Seren bestehen. Es kann also ein Unterschied in der Menge der im Serum vorhandenen Agglutinine mit dieser Methode nicht immer erfaßt werden.

Die Kapillar-Volumenometrie.

Die Kapillar-Volumenometrie ist ein Absorptionsverfahren zur Feststellung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen und zur Bestimmung des Agglutiningehaltes von Seren. Wie bei allen Absorptionsverfahren wird im Gegensatz zur Titrometrie keine Blutkörperchenaufschwemmung gebraucht, sondern ein Sediment von Blutkörperchen, das durch Zentrifugieren gewonnen wird.

Das frisch entnommene Blut wird zur Verhinderung der Gerinnung in Kapillarröhrchen aufgefangen, die vorher mit Liquoid durchgespült worden sind und etwa 1 cm hoch mit Liquoid angefüllt sind. Liquoid ist ein synthetisches gerinnungshemmendes Mittel. Nachdem die Kapillarröhrchen etwa zu einem Drittel mit Blut gefüllt sind, wird das Blut mit dem Liquoid gemischt. Die Mischung setzt sofort ein, wenn der Inhalt des Kapillarröhrchens einmal hin- und herläuft bei schräg gehaltenem Kapillarröhrchen. Danach wird das Kapillarröhrchen vollständig mit Blut gefüllt.

Sind die Kapillarröhrchen gefüllt, so werden sie an einem Ende über der Flamme zugeschmolzen. Dabei muß darauf geachtet werden, daß keine Verbrennungsrückstände von Blutkörperchen zwischen das schmelzende Glas kommen, da sich sonst ein Kanälchen bildet, aus dem der

Inhalt austreten kann. Das Kapillarröhrchen darf also nur bis auf 1 cm vor dem zuzuschmelzenden Ende mit Blut angefüllt sein. Ist es versehentlich doch ganz gefüllt, so wird ein wenig von dem Inhalt wieder entfernt, und das Ende des Kapillarröhrchens, das nun wieder frei von Blut ist, an dessen Wandungen aber doch noch Reste des Blutes sich befinden, wird sehr langsam und vorsichtig an den Rand der Flamme gebracht, damit das Blut an der Öffnung verdampft, ohne zu verbrennen, so daß das zuzuschmelzende Ende wieder frei von jeglichen Blutbestandteilen wird, und bei der Zuschmelzung ein fester Verschluß des Kapillarröhrchens erfolgt.

Der Inhalt des zugeschmolzenen Kapillarröhrchens wird zentrifugiert, zur Abtrennung der Blutkörperchen von dem Serum. Es wird 10 Minuten zentrifugiert. In dieser Zeit findet eine vollkommene Trennung der Blutkörperchen vom Serum statt. Die hierbei entstandene Blutkörperchensäule nimmt ein lackfarbenes, homogenes, durchscheinendes Aussehen an, weil die Blutkörperchen lückenlos aneinanderliegen.

Durch diese Maßnahmen werden die Blutkörperchen, deren Rezeptorstärke bestimmt werden soll, zu einem serumfreien Sediment vorbereitet. Die Vorbereitung geschieht in Kapillarröhrchen von 10 cm Länge und 1—2 mm Weite, so daß nur eine kleine Menge Blut zur Durchführung der Volumenometrie notwendig ist.

Auch das Absorbieren zur Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen wird in Kapillarröhrchen vorgenommen. Dazu wird ein Kapillarröhrchen von ½ bis ¾ mm Weite und 10 cm Länge mit unverdünntem Testserum angefüllt. Testserum bedeutet in diesem Falle das Serum, dessen Stärke bekannt ist, und mit dem die Bestimmung der Rezeptorstärke durchgeführt werden soll. Das Kapillarröhrchen darf nur bis zu einem Drittel seiner Länge also etwa bis zu 30 mm Höhe angefüllt werden. Wird mehr Serum aufgesaugt, so bleibt später, nach Zusatz der Blutkörperchen, nicht genügend Spielraum zur Durchmischung von Testserum und Blutkörperchen.

Ist das Kapillarröhrchen mit Testserum gefüllt, und die Blutkörperchen in der oben beschriebenen Weise für das Zusetzen zum Serum vorbereitet, so wird die Blutkörperchensäule von der darüberstehenden Serumsäule getrennt, indem das Stück des Kapillarröhrchens, das die Serumsäule enthält, mit einer Ampullenfeile abgefeilt wird. Danach wird das zugeschmolzene Ende, das auf der anderen Seite die Blutkörperchensäule begrenzt, ebenfalls abgefeilt. Nun können Blutkörperchen vom Sediment zu dem im Kapillarröhrchen befindlichen Testserum zugesetzt werden. Es werden nur soviel Blutkörperchen zugesetzt, daß der Inhalt in dem Kapillarröhrchen, das das Testserum enthält, um 3 mm ansteigt. Das Ende des Testserum-Kapillarröhrchens wird an den Restkapillarröhrchenteil, der das Blutkörperchensediment enthält, gebracht und zwar so, daß beide einen spitzen Winkel nach

oben bilden. Darauf wird das Kapillarröhrchen mit seinem freien Ende nach abwärts gesenkt, bis die Blutkörperchen hinüberzufließen beginnen. Es muß dabei darauf geachtet werden, daß keine Luftblasen zwischen Serum und zugesetzten Blutkörperchen entstehen, da sonst das Mischen sehr erschwert, sogar unmöglich werden kann.

Nach dem Zusatz der Blutkörperchen werden diese mit dem Testserum gemischt, indem man den Inhalt im Kapillarröhrchen schnell von einem Ende zum anderen fließen läßt, bei senkrecht gehaltenem Kapillarröhrchen. Dadurch werden die noch vom Zentrifugieren her aneinanderhängenden Blutkörperchen voneinander gelöst und im Serum verteilt.

Die zugesetzten Blutkörperchen werden nun sofort von dem Testserum zusammengeballt. Die Zusammenballung erfaßt zunächst alle Blutkörperchen, wobei zuerst größere, bei weiterem Zusetzen kleinere Agglutinate auftreten. Dabei erscheint das Serum in der Umgebung der Agglutinate wasserklar und durchsichtig, denn es sind nur Agglutinate und keine freien Butkörperchen vorhanden. Auch bei weiterem Zufügen von Blutkörperchen ist das Serum noch unverändert, wenn beim Drehen des Kapillarröhrchens um seine Längsachse um etwa 180 Grad an der Unterfläche der Blutkörperchenschicht ein ganz schmaler, heller, durchsichtiger Streifen in der Längsrichtung des Kapillarröhrchens erkennbar ist. An der Grenze der Blutkörperchenschicht zu diesem hellen Serumstreifen hin lassen sich feinste Zacken erkennen, die durch Aneinanderreihung feiner Agglutinate entstanden sind.

Wenn also in dem Serum-Blutkörperchengemisch noch derartige Zacken und der helle Streifen erkennbar sind, so ist das ein Zeichen dafür, daß das Serum bisher noch alle zugesetzten Blutkörperchen agglutiniert hat und noch nicht erschöpft ist. Es müssen also noch Blutkörperchen zugesetzt werden. Während des Hin- und Herfließenlassens wird beobachtet, was mit den zuletzt zugesetzten Blutkörperchen geschieht. Es handelt sich dabei darum, ob noch alle Blutkörperchen agglutiniert werden, oder ob neben den Agglutinaten schon freie Blutkörperchen im Serum auftreten. Ist letzteres der Fall, dann wird das Serum rosafarben und undurchsichtig. Das bedeutet, daß genügend Blutkörperchen zugesetzt sind, daß also das Serum erschöpft ist. Es muß ein geringer Überschuß an nichtagglutinierten Blutkörperchen vorhanden sein, damit die Gewähr gegeben ist, daß die zugesetzten Blutkörperchen auch ihre ganze Rezeptorfähigkeit haben wirken lassen können und alle Agglutinine dem Serum entzogen haben, die sie zu binden fähig sind.

Das Stadium der eingetretenen bzw. ausbleibenden Agglutination muß sehr sorgfältig beobachtet werden. Zu seiner Erkennung genügt die makroskopische Betrachtung.

Sehr wichtig ist auch die Frage der Beleuchtung. Es darf nur immer die gleiche Lichtquelle verwendet werden, das diffuse, helle Tageslicht, wie es durch Milchglasfenster einfällt, ist am günstigsten. Direktes Sonnen- oder Lampenlicht hat eine zu große Durchschlagskraft und macht die exakte Erfassung des Grenzzustandes zwischen eingetretener und ausbleibender Agglutination unmöglich. Denn die feine Rosafärbung des Serums durch freie Blutkörperchen kann nicht erkannt werden. Darum ist es am geeignetsten, die Untersuchungen in den Tagesstunden vorzunehmen.

Ist also der Grenzzustand erreicht, und damit der Anhaltspunkt für den mengenmäßigen Zusatz von roten Blutkörperchen gegeben, dann ist das Absorptionsverfahren beendet. Es kommt nun darauf an festzustellen, wieviele Blutkörperchen prozentual zur Menge des Testserums verbraucht worden sind. Dazu müssen Blutkörperchen bzw. Agglutinate und Serum durch Zentrifugieren wieder voneinander getrennt werden. Zu diesem Zweck wird das Kapillarröhrchen an einem Ende über der Flamme zugeschmolzen; dabei muß das zuzuschmelzende Röhrchenende langsam an die Flamme gebracht werden, denn durch das Mischen von Serum und Blutkörperchen, wobei der Inhalt des Kapillarröhrchens beim Hin- und Herfließen die Enden erreichte, sind an beiden Enden des Röhrchens Blutkörperchen und Serum haften geblieben.

Ist durch das Zuschmelzen ein Verschluß des Kapillarröhrchens erreicht, dann wird es in die Zentrifuge gebracht, und etwa 10 Minuten zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren ist eine Trennung der Agglutinate und Blutkörperchen von dem Serum eingetreten. Die Blutkörperchen haben sich am zugeschmolzenen Ende des Kapillarröhrchens in einer Säule von meßbarer Länge angesammelt. Darüber befindet sich das Serum ebenfalls in einer meßbaren Säule. An einem Millimetermaß werden nun die Längenmaße von Serumsäule und Blutkörperchensäule festgestellt. Es genügt dabei die makroskopische Messung, bei der auch Zwischenwerte von ½ Millimeter berücksichtigt werden können.

Danach wird die Länge der Blutkörperchensäule zur Länge der Serumsäule in der Weise in Beziehung gesetzt, daß aus den beiden gewonnenen Maßen die Länge der Blutkörperchensäule errechnet wird, die einer Serumsäule von 100 mm Länge für das Absorptionsverfahren hätte zugesetzt werden müssen. Das Ergebnis gibt den prozentualen Anteil der roten Blutkörperchen an, die verbraucht worden sind, um dem Testserum alle Agglutinine zu entziehen. —

Die Volumenometrie ist, wie oben dargestellt, ein Absorptionsverfahren zur Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen. Das Kriterium für das Ergebnis dieser Methode ist die Bildung von Agglutinaten. Die Entstehung dieser Agglutinate ist abhängig von der Menge der im Serum enthaltenen Agglutinine und von der Agglutinabilität der roten Blutkörperchen. Das Entscheidende für das Ergebnis

der Volumenometrie ist der Grenzzustand. Die Erkennung dieses Grenzzustandes ist das schwierigste Moment der Methode, das dem Ungeübten anfangs noch Schwierigkeiten bereitet. Durch die oben angeführte genaue Beschreibung der Technik der Volumenometrie ist auf die einzelnen Punkte bereits eingehend hingewiesen, die beachtet werden müssen, um diesen Grenzzustand genau erfassen zu können.

Die Ausführung der Volumenometrie nimmt verhältnismäßig wenig Zeit in Anspruch und läßt sich schneller durchführen als die Titrometrie. Auch der Verbrauch an Serum ist bei der Volumenometrie ein geringerer als bei der Titrometrie, da in dünnen Kapillarröhrchen gearbeitet wird, wozu nur kleine Mengen von Serum erforderlich sind.

Die Anwendung der Objektträger-Titriermethode und der Kapillar-Volumenometrie in Versuchen.

Um zu einem Urteil über die Kapillar-Volumenometrie im Vergleich zur Objektträger-Titriermethode gelangen zu können, sind Versuche durchgeführt worden, in denen die beiden Methoden nebeneinander an ein und demselben Material angewendet worden sind. Es wurden dabei Seren und Blutkörperchen verwandt, die in ihrer Gruppenzugehörigkeit bekannt waren und von Erwachsenen (20. bis 50. Lebensjahr) stammten.

Beide Methoden, wie eingangs bereits erwähnt, können sowohl zur Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen verwendet werden als auch zur Feststellung der Stärke eines Serums, d. h. seines Agglutiningehaltes. Die Objektträger-Titriermethode wird hauptsächlich zur Bestimmung der Serumstärke angewendet, während die Kapillar-Volumenometrie eine Methode ist, die sowohl die Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen als auch des Agglutiningehaltes von Seren ermöglicht.

Sollen alle Versuche ausgeführt werden, um die Volumenometrie im Vergleich zur Objektträger-Titriermethode beurteilen zu können, so müssen zwei Gesichtspunkte ausschlaggebend sein, nämlich einerseits die Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen, andererseits die Bestimmung der Serumstärke. Daraus ergeben sich zwei verschiedene übergeordnete Gesichtspunkte:

I. Die Kapillar-Volumenometrie und Objektrträger-Titriermethode angewendet in Versuchen zur Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen.

II. Die Kapillar-Volumenometrie und Objektträger-Titriermethode angewendet in Versuchen zur Bestimmung des Agglutiningehaltes von Seren und damit der Serumstärken.

I. Die Kapillar-Volumenometrie und Objektträger-Titriermethode, angewendet in Versuchen zur Bestimmung der Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen.

Es wurden Versuchsserien ausgeführt, in denen jeweils ein bestimmtes Testserum, d. h. ein und dasselbe Serum von bekannter Stärke und Gruppenzugehörigkeit und verschiedene rote Blutkörperchen, die von verschiedenen Menschen stammten und die Eigenschaft hatten, die in dem Testserum enthaltenen Agglutinine zu binden, verwendet.

Die Anordnung der Versuche war folgende: Zunächst wurde das Testserum mit den zu untersuchenden Blutkörperchen titriert. Das Ergebnis wurde nach 30 Minuten abgelesen. Während dieser Zeit wurde die volumenometrische Bestimmung der Rezeptorstärke vorgenommen. Um einen Anhaltspunkt für die Richtigkeit des Ergebnisses zu bekommen, wurde die volumenometrische Bestimmung zweimal durchgeführt mit verschieden großen Testserummengen, d. h. ein Kapillarröhrchen wurde etwa 3 cm hoch mit Serum angefüllt, ein anderes mit weniger Serum.

Bei genauer Betrachtung des Grenzzustandes unterschieden sich die beiden Ergebnisse der zweimal durchgeführten volumenometrischen Bestimmung der Rezeptorstärke höchstens um 2—4%. Dazu ist noch zu bemerken, daß das Ergebnis der größeren Menge Testserum immer etwas kleiner war als das der kleineren, denn bei der größeren Menge Testserum ließ sich der Grenzzustand genauer erfassen, da er für die makroskopische Betrachtung besser erkennbar war. Daraus erklärt sich wohl auch, daß ein geringer Unterschied in den beiden Ergebnissen zustande kommen mußte. Wurde dagegen zweimal die gleiche Menge Testserum verwendet, so waren die beiden Ergebnisse fast übereinstimmend. Als Endresultat der zweimal durchgeführten Volumenometrie wurde der niedrigere Wert gewählt.

Nach der Durchführung der volumenometrischen Rezeptorbestimmung wurde das verwendete Serum nachgeprüft, ob es noch Agglutinine enthalte. Es wurden nochmals Blutkörperchen zugesetzt und beobachtet, ob noch eine Agglutination eintrat. Es ergab sich, daß bei genauer Durchführung der volumenometrischen Bestimmung der Rezeptorstärke niemals eine Agglutination bei der Nachprüfung eintrat.

Diese Versuche wurden zunächst mit einem A β-Testserum und verschiedenen B-Blutkörperchen durchgeführt. Um der Kürze halber nicht jeden einzelnen Versuch zu beschreiben und doch die erzielten Ergebnisse darzustellen, sind die Ergebnisse in ein Koordinatensystem eingetragen worden. Auf der Abszisse wurden die Nummern der Versuche und die jeweils verwendeten Blutkörperchen angegeben. Auf der Ordinate wurden die Ergebnisse der beiden Methoden eingezeichnet, die folgendermaßen zueinander in Beziehung gebracht wurden: Zu dem

Titer 1 : 8 gehört die Rezeptorstärke von 10%, zu dem Titer 1 : 16 die Rezeptorstärke von 20% usw.

Die Einzeichnung wurde so vorgenommen, daß bei der entsprechenden Versuchsnummer auf der Abszisse in der Höhe, die dem gefundenen Titerwert entsprach, auf der Ordinate dieser Wert durch einen Punkt gekennzeichnet wurde. Ebenso fand die Eintragung der Rezeptorwerte statt. Die so erhaltenen Punkte der Rezeptorwerte wie auch der Titerwerte wurden durch Linien miteinander verbunden. Dadurch entstanden die Kurven, die auf der beigefügten graphischen Darstellung eingezeichnet sind. Tab. 1.

In den Versuchen 1—9 konnte der Titerwert 1 : 128 abgelesen werden, während in den Versuchen 10—16 der Titer 1 : 64 betrug. Mit Hilfe der Objektträger-Titriermethode lassen sich also die verwendeten Blutkörperchen in 2 verschiedene Gruppen einteilen. Die einen können noch von dem 1 : 128 verdünnten Testserum agglutiniert werden, die andern nur von dem gleichen Serum, das bis 1 : 64 verdünnt wurde.

Betrachtet man die Ergebnisse der Volumenometrie, so zeigt sich, daß die Menge der Blutkörperchen, die jeweils nötig war, um dem Serum alle Agglutinine zu entziehen, zwischen 23% und 40% schwankt. Diese Menge hängt mit der Rezeptorfähigkeit der Blutkörperchen zusammen. Die Menge der Blutkörperchen ist um so größer, je geringer das Bindungsvermögen der Blutkörperchen den Serumagglutininen gegenüber ist. Je weniger Blutkörperchen also gebraucht werden, um dem Serum alle Agglutinine zu entziehen, desto größer ist die Rezeptorfähigkeit der Blutkörperchen. Beurteilt man danach die gefundenen Ergebnisse, wie sie in der graphischen Darstellung aufgezeichnet sind, so läßt sich feststellen, daß die volumenometrische Bestimmung der Rezeptorfähigkeit der roten Blutkörperchen feine Unterschiede ergibt, und damit eine Einteilung der verwendeten Blutkörperchen nach ihrer Rezeptorstärke ermöglicht. Werden dabei gleichzeitig die Ergebnisse der Titrometrie berücksichtigt, so ergibt sich eine gewisse Korrespondenz zu den Ergebnissen der Volumenometrie. Die Rezeptorfähigkeit der einen Gruppe der Blutkörperchen, bei denen der Titer bei 1 : 128 lag, ist größer, was sich auch aus den Ergebnissen der Volumenometrie ergibt, die eine Rezeptorstärke von 23% bis 30% für diese Blutkörperchen angeben.

Die andere Gruppe der Blutkörperchen, bei denen der Titer bei 1 : 64 ablesbar war, hat auch eine geringere Rezeptorfähigkeit, was sich volumenometrisch dadurch zeigt, daß ihre Rezeptorstärke zwischen 32% und 40% liegt. — Mit Hilfe der Volumenometrie lassen sich auch in den beiden Gruppen noch Unterschiede in der Rezeptorstärke der Blutkörperchen feststellen, so daß eine feinere Einteilung der verwendeten Blutkörperchen nach ihrer Rezeptorstärke vorgenommen werden kann, wie es auf der graphischen Darstellung erkennbar ist.

Demnach können die verwendeten B-Blutkörperchen nach den Ergebnissen der Titrometrie nur in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe umfaßt die Blutkörperchen, die den Titer 1 : 128 für das Testserum ergeben und in den Versuchen 1—9 verwendet wurden. In der zweiten Gruppe sind die B-Blutkörperchen enthalten, bei deren Verwendung der Titer des Testserums 1 : 64 betrug, die also in den Versuchen 10—16 verwendet wurden.

Nach den Ergebnissen der Volumenometrie lassen sich viel deutlichere Unterschiede zwischen den verwendeten B-Blutkörperchen finden. Um die Betrachtung analog der vorangehenden durchzuführen, erscheint es zweckmäßig, auch hierbei eine Gruppeneinteilung vorzunehmen, am einfachsten in der Weise, daß man jeweils die Blutkörperchen zu einer Gruppe rechnet, deren Rezeptorstärke zwischen 20% und 25%, bzw. zwischen 25% und 30% liegt usw.

Die erste Gruppe umfaßt die B-Blutkörperchen, die in den Versuchen 1—3 verwendet wurden, die also die volumenometrische Rezeptorfähigkeit von 23%—25% hatten. Sie sind die stärksten, denn von ihnen wurde die geringste Menge benötigt, um dem Testserum alle Agglutinine zu entziehen.

Gruppe 2 enthält die B-Blutkörperchen, die in den Versuchen 4—9 verwendet wurden mit der Rezeptorfähigkeit von 27%—30%.

Die Gruppe 3 bildete die in den Versuchen 10—12 verwendeten B-Blutkörperchen mit den Rezeptorstärken von 32%—34%.

Die 4. Gruppe enthält die B-Blutkörperchen, die in den Versuchen 13—16 untersucht wurden, deren Rezeptorfähigkeit also zwischen 36% und 40% liegt. Sie sind als die schwächsten zu beurteilen, denn von ihnen wurden die größten Mengen gebraucht, um dem Testserum alle Agglutinine zu entziehen.

Nun wurde eine weitere Versuchsserie durchgeführt, wobei ein bebestimmtes B α Testserum und verschiedene A-Blutkörperchen verwendet wurden.

Die Gruppe der A-Blutkörperchen zerfällt in zwei verschiedene Untergruppen der A_1-Blutkörperchen und A_2-Blutkörperchen, die sich durch ihre Rezeptorfähigkeit unterscheiden. Die A_1-Blutkörperchen sind fähig, einem Bα-Serum alle Agglutinine zu entziehen, während die A_2-Blutkörperchen nur einen Teil der Agglutinine binden können, die in einem Bα-Serum enthalten sind.

Darum galt es auch bei den Versuchen mit A-Blutkörperchen eine besonders genaue Untersuchung durchzuführen. Zunächst wurde die Bestimmung der Untergruppenzugehörigkeit vorgenommen nach dem vereinfachten Verfahren von Ponsold. Ein Kapillarröhrchen von ½ mm Weite und 10 cm Länge wurde zu ⅓ seiner Länge mit Bα-Testserum angefüllt. Danach wurde die gleiche Menge der zu untersuchenden

A-Blutkörperchen zugesetzt. Nachdem das Serum mit den Blutkörperchen genügend lange durchmischt war (etwa 5 Minuten), wurde das Kapillarröhrchen an einem Ende zugeschmolzen und in eine Zentrifuge gebracht. Durch das Zentrifugieren fand eine Trennung der Blutkörperchen und Agglutinate von dem Serum statt. Danach wurden dem verwendeten Serum bekannte A_1-Blutkörperchen zugesetzt und beobachtet, ob nochmals eine Agglutination eintrat. Fand keine Agglutination mehr statt, so war das ein Beweis dafür, daß die verwendeten A-Blutkörperchen zur Untergruppe A_1 gehörten, denn sie waren fähig gewesen, dem Testserum alle Agglutinine zu entziehen. Fand aber noch eine Agglutination statt, so gehörten die verwendeten A-Blutkörperchen zur Untergruppe A_2, da sie dem Testserum nicht alle Agglutinine entziehen konnten.

War die Untergruppenzugehörigkeit bestimmt, so schloß sich die Bestimmung der Rezeptorstärke mit den beiden Methoden an. Zunächst wurde die Objektträger-Titriermethode durchgeführt, und während der 30 Minuten, die zwischen der Fertigstellung der Verdünnungsreihen und dem Ablesen des Titers lagen, wurde die kapillarvolumenometrische Rezeptorbestimmung vorgenommen. Diese wurde wieder zur besseren Kontrolle zweimal mit verschieden großen Mengen Testserum durchgeführt. Handelte es sich dabei um A_1-Blutkörperchen, so wurde das verwendete Testserum nochmals mit den gleichen Blutkörperchen nachgeprüft. Es ergab sich dabei niemals mehr eine Agglutination. Standen aber A_2-Blutkörperchen zur Untersuchung, so wurde das verwendete Testserum mit diesen A_2-Blutkörperchen nachgeprüft. Dabei ergab sich keine Agglutination mehr.

Danach wurde das Serum nochmals mit A_1-Blutkörperchen nachgeprüft. Hierbei trat jedes Mal eine sehr deutliche Agglutination ein. Bei dieser Tatsache trat der Gedanke auf, an dem verwendeten Testserum abermals mit A_1-Blutkörperchen die Methode der Volumenometrie durchzuführen, um dadurch feststellen zu können, wieviele A_1-Blutkörperchen noch nötig seien, um aus dem Serum, dem ein Teil seiner Agglutinine durch A_2-Blutkörperchen entzogen wurde, nun alle Agglutinine zu binden. Nachdem also die volumenometrische Rezeptorbestimmung mit A_2-Blutkörperchen durchgeführt war und das verwendete Testserum mit A_2-Blutkörperchen nachgeprüft war, ob ihm auch alle durch A_2-Blutkörperchen zu bindende Agglutinine entzogen seien, wurde dieses Serum zu einer weiteren volumenometrischen Rezeptorbestimmung mit A_1-Blutkörperchen verwendet. Dabei waren noch eine recht beachtliche Menge von A_1-Blutkörperchen nötig, um dem Serum die Agglutinine zu entziehen, die von A_2-Blutkörperchen nicht hatten gebunden werden können. Die Menge der notwendigen A_1-Blutkörperchen wurde jedes Mal prozentual errechnet.

Ein Bα-Serum enthält also einen Teil Agglutinine, der nur von A_1-Blutkörperchen gebunden werden kann, und einen Teil, der von A_2- und A_1-Blutkörperchen gebunden werden kann. Die A_1-Blutkörperchen sind die stärkeren, denn sie können auch die Agglutinine binden, die an sich von den A_2-Blutkörperchen gebunden werden müßten. Wie groß prozentual der Anteil der von A_2-Blutkörperchen zu bindenden Agglutinine ist und der Anteil derjenigen, die von A_1-Blutkörperchen gebunden werden können, läßt sich nicht bestimmen.

Die durchgeführten Versuche mit A_2-Blutkörperchen ergaben folgende Resultate. Die Titerwerte der A_2-Blutkörperchen liegen zwischen 1 : 8 und 1 : 64, die Rezeptorstärken zwischen 16% und 20%. Im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen mit B-Blutkörperchen besteht hier eine direkte Parallelität zwischen Titerwerten und Rezeptorstärken, denn dem niedrigsten Titer von 1 : 8 entspricht hierbei der geringste prozentuale Anteil der A_2-Blutkörperchen von 16%. Nach den bisherigen Erfahrungen mit B-Blutkörperchen geurteilt, müßten nach den Ergebnissen der Volumenometrie diejenigen A_2-Blutkörperchen die stärksten sein, von denen man mengenmäßig am wenigsten braucht, um dem Serum alle Agglutinine zu entziehen, die von A_2-Blutkörperchen gebunden werden können. Würden dagegen die Ergebnisse der Titrometrie berücksichtigt, so wären diejenigen A_2-Blutkörperchen als die stärksten anzusehen, deren Titerwerte am höchsten waren.

Die Nachprüfungen mit A_1-Blutkörperchen ergaben, daß bei Verwendung derjenigen A_2-Blutkörperchen, von denen geringere Mengen zur Absorption gebraucht wurden, größere A_1-Blutkörperchenmengen nötig waren, um das Serum zu erschöpfen. Dagegen waren nach Gebrauch derjenigen A_2-Blutkörperchen, von denen größere Mengen zur Absorption nötig waren, geringere Mengen A_1-Blutkörperchen erforderlich, um das Serum vollständig zu erschöpfen. Diese Beobachtungen lassen folgende Erklärung vermuten: Vielleicht sind einige A_2-Blutkörperchen fähig, auch einen kleinen Teil von den Agglutininen zu binden, die an sich von A_1-Blutkörperchen gebunden werden sollten. Damit wären diese A_2-Blutkörperchen dann auch die stärkeren. Aus den Ergebnissen geht offenbar hervor, daß diejenigen A_2-Blutkörperchen die stärkeren sind, bei denen der Titer höher ablesbar war und von denen gleichzeitig größere Mengen nötig waren, um alle Agglutinine des Serums zu binden, die diese A_2-Blutkörperchen zu binden fähig waren. Aus der gleichzeitigen Nachprüfung mit A_1-Blutkörperchen geht hervor, daß nach Gebrauch dieser stärkeren A_2-Blutkörperchen weniger A_1-Blutkörperchen nötig waren, um das Serum zu erschöpfen.

Anschließend sollen die Versuche mit A_1-Blutkörperchen einer genaueren Betrachtung unterzogen werden.

Die Rezeptorwerte der verwendeten A_1-Blutkörperchen lagen zwischen 30% und 43%, die Titerwerte zwischen 1 : 16 und 1 : 128. Dabei

fiel auf, daß eine Unregelmäßigkeit in den Titerwerten bestand. Bei den zuerst betrachteten B-Blutkörperchen war eine gewisse Übereinstimmung zwischen den Titer- und Rezeptorwerten das Auffallende, was das Ergebnis besonders gut deuten ließ. Bei den A_1-Blutkörperchen fällt dagegen eine Inkonstanz der Titerwerte auf, die in keine Beziehung zu den volumenometrischen Rezeptorwerten zu bringen ist. Nach letzteren zu urteilen, müssen diejenigen Blutkörperchen die stärksten sein, von denen mengenmäßig am wenigsten gebraucht wurden, um dem Testserum alle Agglutinine zu entziehen. Demnach wären die stärksten A_1-Blutkörperchen diejenigen, die die Rezeptorwerte von 30% und wenig darüber hatten, während als schwächste die anzusehen wären, bei denen Rezeptorwerte von 42% und 45% gefunden wurden.

Von den A_1-Blutkörperchen wurden größere Mengen gebraucht, um das Serum vollständig zu erschöpfen. Diese Tatsache erweckt bei oberflächlicher Betrachtung den Eindruck, als seien die A_1-Blutkörperchen schwächer als die A_2-Blutkörperchen. Aber es ist zu bedenken, daß die A_1-Blutkörperchen sowohl die Agglutinine gebunden haben, die nur von A_1-Blutkörperchen gebunden werden können, als auch die Agglutinine, die von A_2-Blutkörperchen gebunden werden können; daß also die A_1-Blutkörperchen ein Bα-Serum vollständig erschöpfen können, während die A_2-Blutkörperchen nur einen Teil der im Bα-Serum enthaltenden Agglutinine binden können. Es läßt sich über die Menge der in dem Serum enthaltenen Agglutinine, die von A_2-Blutkörperchen gebunden werden können, und derjenigen, die nur von A_1-Blutkörperchen gebunden werden können, nichts bestimmtes aussagen.

Bei der Nachprüfung des Serums nach der Absorption mit A_2-Blutkörperchen wurden A_1-Blutkörperchen verwendet, die den Titer 1 : 64 und die Rezeptorstärke von 35% hatten. Danach läßt sich folgendes feststellen: 35% dieser A_1-Blutkörperchen waren nötig, um dem Bα-Serum alle Agglutinine zu entziehen. Im Versuch 7 waren 20% der in diesem Versuch verwendeten A_2-Blutkörperchen nötig, um dem Bα-Serum diejenigen Agglutinine zu entziehen, die von diesen A_2-Blutkörperchen gebunden werden konnten. Es sei darauf hingewiesen, daß diese im Versuch 7 verwendeten A_2-Blutkörperchen als die stärksten der untersuchten A_2-Blutkörperchen angesehen werden konnten. Nach der Agglutininbindung durch diese A_2-Blutkörperchen waren, bei der Nachprüfung mit den A_1-Blutkörperchen, noch 20% dieser A_1-Blutkörperchen nötig, um das Bα-Serum zu erschöpfen, also um die Agglutinine zu binden, die nur von A_1-Blutkörperchen gebunden werden konnten. Aus diesen Ergebnissen läßt sich die A_1-Blutkörperchenmenge errechnen, die benötigt würde, um die Agglutinine zu binden, die von diesen A_2-Blutkörperchen gebunden worden sind. Diese A_1-Blutkörperchenmenge ist nämlich die Differenz zwischen der Menge von den A_1-

Blutkörperchen, die nötig war, um das Bα-Serum zu erschöpfen = 35%, und der Menge von den A_1-Blutkörperchen, die benötigt wurde, um die Agglutinine zu binden, die nach Absorption mit den 20% A_2-Blutkörperchen noch im Serum zurückblieben, = 20% A_1-Blutkörperchen. Demnach ist also die Differenz zwischen 35% und 20%, die 15% beträgt, die Blutkörperchenmenge, die von den A_1-Blutkörperchen benötigt wird, um die Agglutinine zu binden, die 20% der stärksten der verwendeten A_2-Blutkörperchen binden konnten. Nach dieser Berechnung läßt sich feststellen, daß für diejenige Agglutininmenge, die von den stärksten A_2-Blutkörperchen gebunden werden kann, eine geringere Menge einer bestimmten A_1-Blutkörperchenart, die zu den schwächeren A_1-Blutkörperchen gehört, nötig ist, um diese Agglutininmenge zu binden. Diese Tatsache ist ein erneuter Beweis, daß die A_1-Blutkörperchen die stärkeren sind. Es läßt sich durch diese Berechnungen aber nicht ermitteln, wie groß die Menge der Agglutinine ist, die nur von A_1-Blutkörperchen gebunden werden kann, im Verhältnis zu der Agglutininmenge, die sowohl von A_2- als auch von A_1-Blutkörperchen gebunden werden kann.

Nach Versuch 7 beurteilt, ließe sich annehmen, daß beide Agglutinimarten in gleicher Menge vorhanden seien, denn in Versuch 7 wurden 20% dieser A_2-Blutkörperchen gebraucht, um die Agglutinine zu binden, die von diesen A_2-Blutkörperchen gebunden werden konnten, und 20% der A_1-Blutkörperchen, um die Agglutinine zu binden, die nur von A_1-Blutkörperchen gebunden werden können. Aber es ist zu beachten, daß bei Verwendung stärkerer A_1-Blutkörperchen ein geringerer Prozentsatz nötig gewesen wäre, um die Agglutinine zu binden, die nur von A_1-Blutkörperchen gebunden werden können; oder daß bei Verwendung schwächerer A_2-Blutkörperchen ein größerer Prozentsatz von A_1-Blutkörperchen nötig wäre, um die Agglutinine zu binden, die nach Absorption mit schwächeren A_2-Blutkörperchen noch von A_1-Blutkörperchen gebunden werden müssen. Diese letztere Tatsache zeigt sich z. B. bei Betrachtung von Versuch 3. In diesem Versuch wurden 16% A_2-Blutkörperchen benötigt, um die Agglutinine zu binden, die von diesen A_2-Blutkörperchen gebunden werden konnten, und 25% von den im Versuch 7 (s. oben) verwendeten A_1-Blutkörperchen waren danach noch nötig, um die Agglutinine zu binden, die nach Absorption mit diesen A_2-Blutkörperchen noch gebunden werden mußten, um das Serum zu erschöpfen.

Es erscheint demnach nicht möglich, aus den prozentualen Anteilen der A_1- und A_2-Blutkörperchen einen Schluß zu ziehen, wie groß die Agglutininmenge ist, die nur von A_1-Blutkörperchen gebunden werden kann im Verhältnis zu der Agglutininmenge, die sowohl von A_2- als auch von A_1-Blutkörperchen gebunden werden kann.

Es hat sich in den Versuchen nur gezeigt, daß die volumenometrischen Anteile der A_1-Blutkörperchen bedeutend höher liegen als die der A_2-Blutkörperchen. Das erklärt sich dadurch, daß die A_1-Blutkörperchen ein Bα-Serum vollständig erschöpfen können, also alle Agglutinine binden, sowohl diejenigen, die von A_2-Blutkörperchen gebunden werden können, als auch diejenigen, die nur von A_1-Blutkörperchen gebunden werden können.

Zu den Versuchen mit A_2-Blutkörperchen ist noch folgendes zu bemerken, was erst anschließend an die Betrachtung der A_1-Blutkörperchen angeführt werden kann.

Nach den ersten 3 Versuchen mit A_2-Blutkörperchen fielen die besonderen niedrigen volumenometrischen Rezeptorwerte auf, im Gegensatz zu den A_1-Blutkörperchen. Dadurch tauchte die Frage auf, ob es nicht möglich wäre, mit Hilfe der volumenometrischen Rezeptorbestimmung eine Untergruppenbestimmung der A-Blutkörperchen vornehmen zu können, wenn es sich weiterhin erwies, daß dieser Unterschied zwischen A_2- und A_1-Blutkörperchen bestand. Bei den darauf folgenden Versuchen wurde also zunächst keine Untergruppenbestimmung durchgeführt, sondern zunächst der Titer und die volumenometrische Rezeptorfähigkeit bestimmt. Ergab letztere sehr niedrige Werte von 20% und darunter, so wurde daraus zunächst die Annahme gefolgert, daß es sich um A_2-Blutkörperchen handeln könnte. Es folgten nun die Nachprüfungen des bereits verwendeten Testserums, wie sie oben bereits bei den A_2-Blutkörperchen erwähnt wurden. Die Nachprüfung mit den gleichen wie bei der volumenometrischen Rezeptorbestimmung verwendeten A-Blutkörperchen ergab keine Agglutination, während nach Zusatz bekannter A_1-Blutkörperchen abermalige Agglutination eintrat. Diese Feststellung bestärkte die Annahme, daß es sich bei den verwendeten A-Blutkörperchen um A_2-Blutkörperchen handelte.

Daran schloß sich die bekannte Bestimmung der Untergruppenzugehörigkeit der verwendeten A-Blutkörperchen an, die dann auch jedes Mal ergab, daß es sich um A_2-Blutkörperchen gehandelt hatte.

Leider standen zu wenige A_2-Blutkörperchen zur Verfügung, um einen absolut sicheren Beweis erbringen zu können, daß mit Hilfe der volumenometrischen Rezeptorbestimmung eine Untergruppenbestimmung von A-Blutkörperchen vorgenommen werden kann. Da diese Frage in dem Thema dieser Arbeit nicht enthalten ist, sondern nur im Verlauf der Versuche auftauchte und dadurch zu den erwähnten Untersuchungen Anlaß gab, wurde ihr nur insoweit nachgegangen, als A_2-Blutkörperchen zur Verfügung standen.

In den angeführten Versuchsreihen wurden die Objektträger-Titriermethode und die kapillarvolumenometrische Rezeptorbestimmung verwendet, um die Rezeptorfähigkeit und damit die Rezeptorstärke der roten Blutkörperchen zu bestimmen. Aus den Ergebnissen geht hervor,

daß die kapillarvolumenometrische Rezeptorbestimmung der Objektträger-Titriermethode an Genauigkeit überlegen ist, was sich besonders in den Versuchen zeigte, die mit B-Blutkörperchen durchgeführt wurden.

Eingangs wurde bereits erwähnt, daß die Objektträger-Titriermethode hauptsächlich zur Bestimmung von Serumstärken verwendet wird. Dazu kann auch die kapillarvolumenometrische Rezeptorbestimmung verwendet werden, wenn man eine bestimmte Art Testblutkörperchen verwendet und von der Menge der verwendeten Testblutkörperchen aus eine Einteilung der Seren nach ihrem Agglutiningehalt vornimmt.

Die Aufgabe der folgenden Versuche wird es sein, festzustellen, ob sich die volumenometrische Rezeptorbestimmung auch zur quantitativen Bestimmung von Seren verwenden läßt. Als Vergleich für die Ergebnisse wird die Objektträger-Titriermethode herangezogen.

II. Die Kapillar-Volumenometrie und Objektträger-Titriermethode, angewendet in Versuchen zur Bestimmung des Agglutiningehaltes von Seren und damit der Serumstärken.

Die Anordnung der Versuche.

Bestimmte Testblutkörperchen, d. h. einer bestimmten Gruppenzugehörigkeit und eines Menschen wurden verwendet und verschiedene Seren, die von verschiedenen Menschen stammten und nur solche Agglutinine besaßen, die von den Blutkörperchen gebunden werden bzw. die Blutkörperchen agglutinieren konnten. Die Seren und Blutkörperchen stammten von Erwachsenen zwischen 20 und 50 Jahren.

Zunächst wurde jeweils die Objektträger-Titriermethode durchgeführt und anschließend die Methode der Kapillar-Volumenometrie. Letztere wurde in der Zeit ausgeführt, die zwischen dem Fertigstellen der Verdünnungsreihe und dem Ablesen des Titers lag (30 Minuten). In den früheren Versuchen, bei denen die volumenometrische Rezeptorbestimmung zweimal durchgeführt worden war mit jeweils verschieden großen Testserummengen, wurde gefunden, daß bei der größeren Menge Testserum weniger Blutkörperchen gebraucht wurden, weil das Grenzstadium besser erfaßt werden konnte. Zudem bestand bei der größeren und kleineren Testserummenge nur ein geringer Unterschied in der verbrauchten Menge Blutkörperchen von 2—4%. Darum wurde der Zeitersparnis halber die Methode der Volumenometrie bei diesen Versuchen nur einmal durchgeführt mit der größtmöglichen Menge Serum, d. h. das Kapillarröhrchen wurde bis zu ⅓ seiner Länge mit dem zu untersuchenden Serum angefüllt.

Die Ergebnisse der Versuche wurden in der gleichen Weise graphisch dargestellt wie oben bei den vorhergehenden Versuchen bereits beschrieben wurde.

Zunächst wurden verschiedene Bα-Seren verwendet und A_1-Testblutkörperchen, diese waren vorher bei dem Versuch 16 in der Reihe der A_1-Blutkörperchen verwendet worden, wobei zur Bestimmung der Rezeptorfähigkeit den Titer 1 : 64 und den volumenometrischen Anteil von 34% für diese A_1-Blutkörperchen ergeben hatten.

Betrachtet man nun die graphische Darstellung dieser Versuchsreihe, Tab. 2, so läßt sich feststellen, daß eine recht deutliche Parallelität zwischen den Ergebnissen der Titrometrie und Volumenometrie besteht. Nach den Ergebnissen der Titrometrie sind die verwendeten Bα-Seren den verschiedenen Verdünnungsstufen entsprechend in 4 Gruppen einzuteilen, und zwar umfaßt die erste Gruppe 3 Seren mit dem Titer 1 : 32, die zweite Gruppe 6 Seren mit dem Titer 1 : 64, die dritte Gruppe 5 Seren mit dem Titer 1 : 128 und die vierte Gruppe 4 Seren mit dem Titer 1 : 256. Danach wären also in der 1. Gruppe die schwächsten Seren enthalten, die die geringste Menge Agglutinine enthielten, denn sie waren nur bis zu einer Verdünnung von 1 : 32 fähig, die Testblutkörperchen zu agglutinieren. Dagegen waren in der vierten Gruppe die stärksten Seren mit der größten Menge Agglutinine enthalten, denn diese Seren waren bis zu einer Verdünnung von 1 : 256 fähig, die A_1-Testblutkörperchen zu agglutinieren.

Die Ergebnisse der Volumenometrie ermöglichen eine etwas andere Gruppeneinteilung im Sinne einer weitgehenderen Differenzierung, wenn diese nach den Grenzen von je 5% Zunahme des prozentualen Anteiles der Testblutkörperchen erfolgt.

Erste Gruppe: Serum 1—3, diese Seren enthielten so wenig Agglutinine, daß nach der volumenometrischen Bestimmung nur 27% —30% Testblutkörperchen benötigt wurden, um diesen Seren alle Agglutinine zu entziehen. Die zweite Gruppe umfaßt etwa die Seren 4—7, die 32%—35% Testblutkörperchen zur Bindung ihrer Agglutinine benötigten. Zur dritten Gruppe gehören demnach die Seren 8—11, zu deren Agglutininbindung 38%—40% Testblutkörperchen verbraucht wurden. In der vierten Gruppe sind die Seren 12—15 enthalten, die etwa 43% Testblutkörperchen zur Bindung ihrer Agglutinine brauchten. Die fünfte Gruppe schließlich umfaßt die Seren 16—18, die die größte Menge Agglutinine enthielten und darum 47%—49% Testblutkörperchen zu deren Bindung benötigten.

Nach den Ergebnissen der Volumenometrie läßt sich also eine genaue Differenzierung der Seren vornehmen, denn innerhalb der volumenometrisch gefundenen Gruppen lassen sich noch geringe Unterschiede im Agglutiningehalt der Seren feststellen; was darin zum Ausdruck kommt, daß teilweise noch geringe Unterschiede in der volu-

menometrischen Rezeptorbestimmung der Testblutkörperchen mit den verschiedenen Seren der einzelnen Gruppen bestehen. Das zeigt sich am deutlichsten in den ersten drei Gruppen.

In der folgenden Serie wurden verschiedene Aβ-Seren für die Versuche verwendet und Testblutkörperchen der Gruppe B, die in den früheren Versuchen mit B-Blutkörperchen im Versuch 10 verwendet worden waren, also den Titer 1 : 64 und die volumenometrische Rezeptorfähigkeit von 32% hatten. Die Anordnung der Versuche wurde hierbei in anderer Reihenfolge vorgenommen.

Zunächst wurde die Methode der Volumenometrie durchgeführt. Von der Menge der dabei verbrauchten Testblutkörperchen konnte dann die Anlegung der Verdünnungsreihen für die nachfolgende Durchführung der Titrometrie abhängig gemacht werden. Wurden nur relativ wenige Testblutkörperchen bei der Volumenometrie benötigt (weniger als 30%), so konnte die Verdünnung des Serums bei 1 : 128 abgebrochen werden. Es ergab sich dann beim Ablesen des Titers, daß diese Verdünnungsstufe nie mehr eine Agglutination zeigte. Es hatte also eine Zeitersparnis bedeutet, bei dieser Verdünnungsstufe die weitere Verdünnung abzubrechen, die sonst stets bis 1 : 1024 durchgeführt wurde. Außerdem konnte bei dieser Versuchsanordnung festgestellt werden, daß die Durchführung der Volumenometrie höchstens ½—¾ der Zeit beanspruchte, die zur Durchführung der Titrometrie benötigt wurde.

Ähnlich wie bei den vorhergehenden Versuchen zeigt sich eine gewisse Parallelität zwischen den Ergebnissen der Titrometrie und Volumenometrie. Nach den Ergebnissen der Titrometrie läßt sich folgende Gruppeneinteilung der Seren vornehmen:

1. Gruppe: Serum 1— 2 mit dem Titer 1 : 16,
2. Gruppe: Serum 3 mit dem Titer 1 : 32,
3. Gruppe: Seren 4— 8 mit dem Titer 1 : 64,
4. Gruppe: Seren 9—13 mit dem Titer 1 : 128,
5. Gruppe: Seren 14—17 mit dem Titer 1 : 256.

Die Ergebnisse der Volumenometrie lassen nicht die gleiche Gruppeneinteilung erkennen. Danach ergäbe sich eine etwas andere Gruppierung.

1. Gruppe, Seren 1—4 mit der volumenometrischen Rezeptorfähigkeit der Testblutkörperchen von 22%—25%. Diese Seren sind als die schwächsten anzusehen, denn es waren nur 22%—25% Testblutkörperchen nötig, um den Seren alle Agglutinine zu entziehen.

Gruppe 2 umfaßt die Seren 5—9, die die volumenometrische Rezeptorfähigkeit von 27%—30% der Testblutkörperchen benötigten, um alle Agglutinine entzogen zu bekommen.

In Gruppe 3 sind die Seren 10—12 enthalten, die 33%—35% der Testblutkörperchen zur Bindung ihrer Agglutinine benötigten.

Gruppe 4 enthält die Seren 13—15, zu deren Agglutininbindung 37%—40% Testblutkörperchen benötigt wurden.

Gruppe 5 endlich umfaßt die Seren 16 und 17, die als die stärksten anzusehen sind, denn es waren 42%—43% Testblutkörperchen nötig, um all ihre Agglutinine zu binden.

Die letzte Versuchsserie beschäftigt sich mit der Untersuchung verschiedener O$\alpha\beta$-Seren, wobei bestimmte AB-Blutkörperchen als Testblutkörperchen verwendet wurden.

Auch in dieser Versuchsreihe zeigt sich, daß eine gewisse Parallelität zwischen den Ergebnissen der Titrometrie und Volumenometrie besteht. Eine Ausnahme bildet das im Versuch 11 verwendete Serum. Bei diesem war der Titer relativ hoch ablesbar, während für die Durchführung der Volumenometrie nicht entsprechend mehr Blutkörperchen benötigt wurden, um dem Serum alle Agglutinine zu entziehen.

Nach den Ergebnissen der Titrometrie lassen sich die verwendeten Seren in 7 verschiedene Gruppen einteilen. Die erste Gruppe mit dem Titer 1 : 8 enthält Serum 1, das danach als das schwächste anzusehen wäre. Die zweite Gruppe mit dem Titer 1 : 16 enthält Serum 2. Die dritte Gruppe hat den Titer 1 : 32, zu ihr gehören die Seren 3—5. Die vierte Gruppe umfaßt die Seren 6—9 mit dem Titer 1 : 64. Zur fünften Gruppe gehören die Seren 10, 12, 13, 14 mit dem Titer 1 : 128. In der sechsten Gruppe, die den Titer 1 : 256 hat, finden sich die Seren 11, 15, 16. Und endlich die 7. letzte Gruppe mit dem Titer 1 : 1028 enthält die stärksten Seren 17 und 18.

Nach den Ergebnissen der Volumenometrie wäre die Gruppeneinteilung etwas anders vorzunehmen. Danach wären in Gruppe 1 die Seren 1—4 enthalten, die 22%—25% der Testblutkörperchen benötigten, um erschöpft zu werden. Die zweite Gruppe umfaßt die Seren 5 und 6, für deren Erschöpfung 28%—30% Testblutkörperchen nötig waren. Zur dritten Gruppe gehören die Seren 7 und 8, die 32% Testblutkörperchen zur Bindung ihrer Agglutinine benötigten. In Gruppe 4 sind die Seren 9—11 enhalten, die 40%—45% Testblutkörperchen benötigten, um erschöpft zu werden. Gruppe 5 umfaßt die Seren 12—15, zu deren Agglutininbindung 46%—50% Testblutkörperchen nötig waren. In Gruppe 7 ist Serum 16 enthalten mit einem Testblutkörperchenverbrauch von 54%. Gruppe 8 endlich umfaßt die stärksten Seren 17 und 18, die 67% Testblutkörperchen benötigten, um völlig erschöpft zu werden.

Bei der Durchführung dieser letzten Versuchsreihe fielen die besonders hohen Titerwerte einiger Seren auf, die bisher noch bei keinem der Aβ-, oder Bα-Seren erreicht wurden. Dementsprechend wurden auch bei der Durchführung der Volumenometrie besonders große Mengen Testblutkörperchen verbraucht.

Andererseits fanden sich hierbei auch Seren mit besonders niedrigen Titerwerten, die dann auch besonders wenig Testblutkörperchen zur Bindung ihres Agglutiningehaltes benötigten.

Es konnte also festgestellt werden, daß unter diesen O$\alpha\beta$-Seren besonders starke Seren zu finden sind mit dem Titer 1 : 1028 und die volumenometrisch 67% Testblutkörperchen benötigten, um erschöpft zu werden. Andererseits kommen darunter auch sehr schwache Seren vor mit dem Titer 1 : 8, die nur 22% Testblutkörperchen zur Bindung ihrer Agglutinine benötigten.

Betrachtet man die Ergebnisse der drei letzten Versuchsreihen, in denen versucht wurde, die Serumstärke mit Hilfe der Volumenometrie und der Titrometrie festzustellen, so wurde schon darauf hingewiesen, daß die Ergebnisse eine gewisse Parallelität aufweisen, und daß die Ergebnisse beider Methoden eine Gruppeneinteilung der Seren ermöglichen. Dabei findet man, daß bei den Gruppen, die durch die Ergebnisse der Titrometrie gefunden werden, sich keine weiteren Unterschiede der Seren innerhalb einer Gruppe finden lassen. Das liegt an der Methode der Titrometrie. Die weite Stufenfolge zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen der Seren bringt es mit sich, daß der Titer mehrerer Seren, die sich noch in ihrem Agglutiningehalt unterscheiden können, auf der gleichen Stufe ablesbar ist.

Die Gruppeneinteilung der Seren nach den Ergebnissen der Volumenometrie richtet sich nach dem Verbrauch der zum Erschöpfen der Seren benötigten Testblutkörperchen. Diese Gruppeneinteilung ist an sich belangloser, weil die Methode der Volumenometrie keine bestimmten Abstufungen für die zuzusetzende Menge der Testblutkörperchen hat, sondern eine Erschöpfung jedes einzelnen Serums ermöglicht. Sie wurde nur vorgenommen, um einen besseren Vergleich der beiden Methoden durchführen zu können und beide von dem gleichen Gesichtspunkt aus zu beurteilen.

Zusammenfassung.

Es sind Versuche durchgeführt worden, um die Methode der Kapillar-Volumenometrie im Vergleich zur Objektträger-Titrometrie auf ihre Brauchbarkeit zur Bestimmung der Rezeptorstärken von roten Blutkörperchen und zur Bestimmung des Agglutiningehaltes von Seren zu untersuchen.

Aus den Ergebnissen der Versuche geht hervor, daß die Kapillar-Volumenometrie sowohl zur Bestimmung der Rezeptorstärken verwendbar ist als auch zur Bestimmung der Serumstärken. Die Bestimmungen fallen genauer aus, als dies mit der Objektträger-Titrometrie möglich ist, wobei unter „genauer“ eine feinere Differenzierung der verschie-

denen Blutkörperchen bzw. Seren zu verstehen ist. Diese feinere Differenzierung wäre auch mit der Objektträger-Titrometrie möglich, wenn diese Methode nicht in der üblichen Verdünnungsstufenfolge vorgenommen würde, sondern wenn zwischen die üblichen Verdünnungsstufen noch zahlreiche andere Verdünnungsstufen eingeschoben würden. Damit würde aber diese Methode eine sehr umständliche werden.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. Schrader sowie Herrn Doz. Dr. Ponsold für die Überlassung des Themas und ihre Unterstützung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

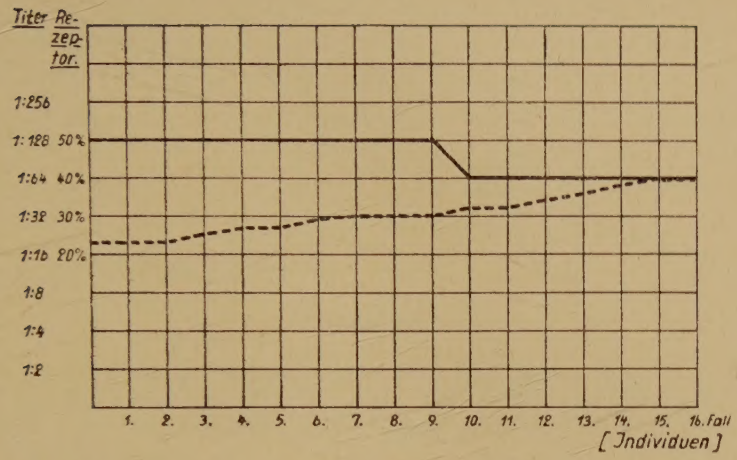
Schrifttum.

Eckard: Titrierungsversuche mittels der verschiedenen Methoden der Blutgruppenbestimmung. Medizinische Dissertation Halle, 1935.

Ponsold: Die Bestimmbarkeit der Blutgruppenzugehörigkeit an frischem Blut im Glaskapillarröhrchen. Münchner Medizinische Wochenschrift 1933, Nr. 41.

— Ein Mikroabsorptionsverfahren zum Nachweis der Blutgruppen A_1 und A_2. Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin 28. Bd., 1.—3. Heft, 1937.

— Eine Mikromethode zur quantitativen Auswertung kleinster Serummengen. Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtl. Medizin, 23. Bd., 1. Heft, 1934.



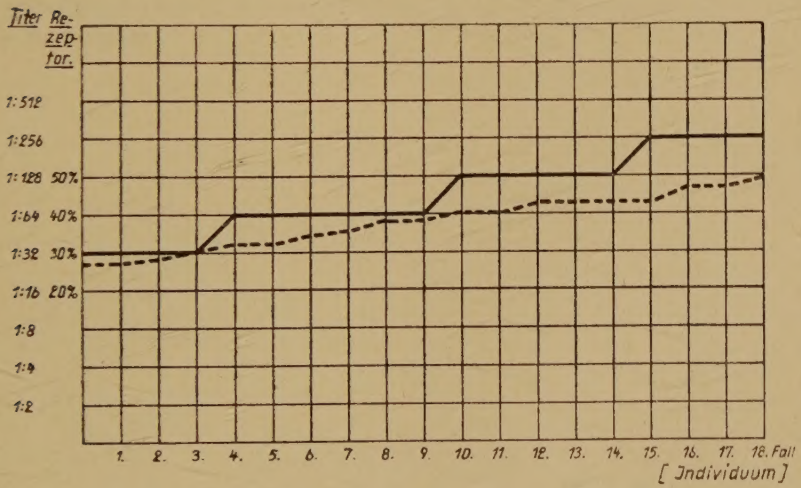
Tab. 1.

———— Gleichbleibendes Serum A_3 [= Testserum]

- - - - - - - - - Blutkörperchen B verschiedener Individuen.

Vergleich des Titers ——— mit der Rezeptorstärkenzahl ------

Ergebnis: bei fast gleichbleibendem Titer weitgehendere Differenzierung durch Rezeptorstärkenbestimmung bzw. bei abfallendem Titer ansteigende Rezeptorzahl.



Tab. 2.

———— Gleichbleibende Blutkörperchen A_1 [= Testblutkörperchen]

- - - - - - - - - [Verschiedene] Seren Bα verschiedener Individuen.

Vergleich des Titers ——— mit der Mengenverhältniszahl ------

Ergebnis: fast paralleler Verlauf, aber durch Verhältniszahl größere Differenzierbarkeit.

Lebenslauf.

Als Tochter des Rittergutsbesitzers Max Haellmigk und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Schmidt wurde ich, Frieda Haellmigk, am 24. Mai 1911 in Buchholz, Kreis Calau, geboren. Ich bin deutsche Staatsangehörige.

Ich besuchte die realgymnasiale Studienanstalt des Augusta-Lyzeums in Cottbus, wo ich im März 1932 die Reifeprüfung bestand.

Danach begann ich am 1. Mai 1932 das Studium der Medizin in München, legte dort nach 5 vorklinischen Semestern das Physikum am 20. Juli 1934 ab. Während der klinischen Semester studierte ich in München, Kiel, Berlin und Halle. In Halle bestand ich nach dem 6. klinischen Semester das Med. Staatsexamen am 4. Januar 1938.

Seit dem 10. Januar 1938 bin ich als Medizinalpraktikantin am Knappschaftskrankenhaus in Senftenberg N.L. bei Herrn Prof. Dr. Grauhan tätig.